

редокс-чувствительных молекул), принимающих участие в развитии сократительного ответа гладкой мышцы.

Таким образом, вазоактивный эффект супероксид-аниона, образующегося в клетках стенки коронарных сосудов, зависит от уровня образования и баланса веществ, обладающих вазоконстрикторными и вазодилаторными свойствами, и конечно же, от исходного тонуса коронарных сосудов.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, договор Б03-240.

Литература

1. Новикова Е.Б. Об ауторегуляции в коронарной системе. Физиол. журнал. №1 : 61-74.1972.
2. Солодков А.П., Дорошенко А.С., Шебеко В.И., Щербинин И.Ю. Эндотелий, ауторегуляция коронарных сосудов и стресс // Вестник Фонда фундаментальных исследований. – Минск, 2005. -№1. – С.84-99.
3. Шебеко В.И., Дорошенко А.С., Солодков А.П., Манухина Е.Б., Цвирко И.А., Ванин А.Ф. Редокс-регуляция депонирования оксида азота в сердечно-сосудистой системе // Вестник Витебского государственного медицинского университета. - 2004. – Т.3, №4. – С.8-16.
4. Abe J-i., Berk B. C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. Trends Cardiovasc. Med. 8 : 59-64. 1998.
5. Coleman H.A., Tare M., Parkington H. C. Endothelium-dependent depolarization and its implications for endothelium-derived hyperpolarizing factor // EDHF 2002.- Edited by Paul M. Vanhoutte.-Taylor & Francis, 2003.- P.199-205.

РОЛЬ СУПЕРОКСИД-АНИОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ И СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ МИОКАРДА ПРИ СТРЕССЕ И ВВЕДЕНИИ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА.

Дорошенко А.С., Солодков А.П., Шебеко В.И.

***УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет», Центральная
научно-исследовательская лаборатория, Беларусь***

Длительное и интенсивное психоэмоциональное или физическое напряжение – это наиболее распространенная причина стрессовых реакций, сопровождающихся нарушением коронарного кровообращения [1].

В патогенезе стрессорных повреждений мышцы сердца и коронарных сосудов важная роль принадлежит активации перекисного окисления липидов, действию избытка катехоламинов, а также гиперпродукции монооксида азота и активных форм кислорода, имеющих важное значение в развитии постстрессорных нарушений тонуса сосудов сердца [1,2]. В то же время мало известно о роли редокс-состояния в механизмах постстрессорного нарушения ауторегуляции сосудов сердца. Редокс-регуляция фенотипических свойств клеток обеспечивается посредством изменения функции протеинов и, возможно, других молекул вследствие их окисления/восстановления. Соотношение между тиоловыми и дисульфидными группами белков и пептидов отражает баланс между выраженностью образования и действия АФК и эффективностью функционирования редокс-систем клетки. Важная роль в поддержании редокс-состояния клеток принадлежит редокс-системе глутатиона (восстановленный/окисленный глутатион)

В связи с тем, что стресс сопровождается активацией свободно-радикального окисления и окислением глутатиона и белковых молекул [2,3,4,5], представляется перспективным использовать предварительное введение N-ацетил-L-цистеина для ограничения постстрессорных нарушений функции коронарных сосудов и сократительной функции миокарда [1,2].

Цель настоящего исследования – определить роль супероксид-анионов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда в зависимости от их взаимодействия с монооксидом азота и выраженности изменений редокс-состояния клеток сердца в норме и при стрессе, а также оценить возможность ограничения нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда низкомолекулярным тиолсодержащим антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином.

Материал и методы исследования

Опыты были выполнены на крысах-самках линии Вистар, массой 240- 320 г. Коронарный поток и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах изолированного по Лангендорфу сердца, перфузируемого в условиях постоянного давления и сокращающегося в спонтанном ритме. Сердце перфузировали раствором Кребса - Хензелейта pH – 7,3-7,4; насыщенного карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂) при температуре 37°C. Животных делили на экспериментальные группы в зависимости от применяемых препаратов и продолжительности стрес-

сорного воздействия. В качестве стрессора использовали 0,5-ти и 6-часовую иммобилизацию.

Результаты исследований и их обсуждение

Роль супероксид-анионов в регуляции тонуса коронарных сосудов в условиях моделирования различного редокс-состояния клеток сердца. Улавливание супероксид-анионов тироном (химическая ловушка супероксид-анионов, 4,5-дигидрокси-1,3-бензенидисульфоновая кислота, 10 мМоль/л, Sigma USA), сопровождалось снижением тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда. Блокада синтеза монооксида азота L-NAME (конкурентный ингибитор NO-синтазы метиловый эфир N- ω -нитро-L-аргинина, 60 мкМ/л, Sigma USA) или растворимой гуанилатциклазы метиленовой синью (20 мкМ, Sigma USA) полностью устраняла, а избыток L-аргинина (400 мкМ, Sigma USA), вводимый на фоне блокады синтеза монооксида азота, восстанавливал вызываемое тироном увеличение ОСКП. Таким образом, можно заключить, что влияние супероксид-анионов на тонус коронарных сосудов, зависит от биологического действия монооксида азота. Можно предположить, что наибольшее значение в регуляции тонуса сосудов имеет продукция супероксид-анионов в эндотелиальных клетках коронарных сосудов, так как именно там имеется значительное напряжение активности синтеза монооксида азота.

Острое изменение редокс-состояния клеток сердца посредством введения N-ацетил-L-цистеина (40 мг/кг, pH раствора 7,3-7,4, Sigma USA) – увеличивал концентрацию глутатиона на 16% в миокарде или L-бутионин-S,R-сульфоксимины (необратимый ингибитор ключевого фермента биосинтеза глутатиона – γ -глутамилцистеинсинтазы, бутионинсульфоксимины, 2 мкМ/кг, Sigma USA) – уменьшал концентрацию глутатиона в миокарде и эритроцитах на 37% и в 2,2 раза снижал тиол/дисульфидное соотношение в эритроцитах, не влияя на ОСКП, но приводило к снижению индекса ауторегуляции на 32-52%. Это указывает на то, что оба эти вещества, несмотря на разнонаправленное влияние на редокс-состояние клеток, в одинаковой степени нарушали способность сосудов к ауторегуляции.

Связывание супероксид-анионов тироном в изолированных сердцах животных, предварительно получавших N-ацетил-L-цистеин, сопровождалось в среднем на 10% большим увеличением ОСКП, чем в контроле, и на 24% более значительным уменьшением индекса ауторегуляции. Максимальный гиперемический коронарный поток под влиянием тирона не изменялся, а коронарный расширительный резерв

снижался в такой же степени, как и в контроле. Развиваемое внутрижелудочковое давление в группе животных, получавших N-ацетил-L-цистеин, снижалось под влиянием тирона в среднем на 27% меньше, по сравнению с контрольной группой (17%, против 44% в контроле).

Внутрикоронарное введение тирона на фоне снижения содержания восстановленного глутатиона, вызываемого L-бутионин-S,R-сульфоксимином, сопровождалось увеличением ОСКП, но это увеличение на 18% было менее выражено, чем в контроле.

Таким образом, усиление эффекта тирона, наблюдающееся при увеличении содержания восстановленного глутатиона в миокарде и ослабление действия тирона при уменьшении содержания восстановленного глутатиона в миокарде, свидетельствует о существовании зависимости между эффективностью действия монооксида азота, на тонус сосудов сердца и содержанием восстановленного глутатиона. Значит существует явная зависимость физиологического действия NO от редокс-состояния клеток сердца.

Роль супероксид-анионов в регуляции тонуса сосудов сердца и сократительной функции миокарда крыс, перенесших стресс различной продолжительности. Получасовая иммобилизация не изменяла тонус коронарных сосудов, их способность к ауторегуляции и показатели сократительной функции миокарда, но сопровождалась нарушением развития реактивной гиперемии (максимальный гиперемический коронарный поток уменьшался на 26%). Это снижение наблюдалось на фоне увеличения в плазме крови на 78% продуктов превращения монооксида азота (NO_2/NO_3), свидетельствуя об активации его синтеза. В связи с тем, что монооксид азота играет важную роль в механизме развития реактивной гиперемии, можно заключить, что падение величины максимального гиперемического коронарного потока при кратковременном стрессе, вероятно, обусловлено снижением его биодоступности.

Интракоронарное введение тирона в изолированное сердце крыс, перенесших 0,5-ти часовую иммобилизацию, сопровождалось в 3,5 раза менее выраженным увеличением ОСКП при неизменном индексе ауторегуляции и коронарном расширительном резерве. Развиваемое внутрижелудочковое давление, как и в контроле, уменьшалось на 29-37%.

На фоне интракоронарного введения L-NAME тирон не оказывал влияния на ауторегуляцию коронарного потока, но на 20% больше снижал развиваемое внутрижелудочковое давление, чем при введении только L-NAME.

Таким образом, при кратковременном стрессорном воздействии

уменьшается роль супероксид-анионов в регуляции тонуса коронарных сосудов и в значительной степени возрастает зависимость влияния супероксид-анионов на сократительную активность миокарда от состояния его NO-синтазной системы.

Шестичасовой иммобилизационный стресс приводил к увеличению ОСКП, на фоне снижения развиваемого внутрижелудочкового давления, что свидетельствует о развитии при этом состоянии явления гиперперфузии сердца и нарушении существующей в норме тесной взаимосвязи величины коронарного потока и сократительной функции миокарда.

Связывание супероксид-анионов в сердце крыс, перенесших 6-ти часовую иммобилизацию, сопровождалось менее выраженным, чем в контроле, увеличением ОСКП, которое полностью устранялась при блокаде синтеза монооксида азота. Следовательно, как и в контроле, так и при 0,5-ти и 6-ти часовом иммобилизационном стрессе действие супероксид-анионов на тонус коронарных сосудов обусловлено их взаимодействием с монооксидом азота. Более того, влияние супероксид-анионов на тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда изменяется в зависимости от продолжительности стрессорного воздействия: значительно снижается при кратковременном и незначительно уменьшается при длительном иммобилизационном стрессе.

Кратковременный стресс (0,5 часа) сопровождался активацией процессов перекисного окисления липидов (концентрации диеновых конъюгатов и малонового диальдегида возросли на 78 и 184%, соответственно). Данная активация свободнорадикального окисления происходила на фоне уменьшения содержания в ткани миокарда восстановленного глутатиона на 23% и повышение активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в 3,1 и 3,37 раза, что свидетельствует о выраженной активности системы глутатиона и отражает значительную потребность клеток миокарда и коронарных сосудов в восстановленном глутатионе.

После 6-ти часового иммобилизационного стресса в эритроцитах отмечалось выраженное уменьшение тиол/дисульфидного соотношения, а в миокарде — достоверное снижение содержания белковых и небелковых SH— групп на 57% и 22% соответственно. Эти изменения выявлялись на фоне повышения активности процессов перекисного окисления липидов (концентрация диеновых конъюгатов увеличилась в 2,2 раза, малонового диальдегида в 3,1 раза), активности ферментов антиоксидантной защиты глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы на 125% и 75% соответственно и снижения активности су-

пероксиддисмутазы в миокарде на 35%.

Таким образом, при кратковременном и продолжительном иммобилизационном стрессе на фоне активации ферментов системы глутатиона обнаруживается снижение содержания глутатиона в миокарде (0,5-ти и 6-ти часовой стресс) и белковых (только 6-ти часовой стресс) сульфгидрильных групп, а также тиол/дисульфидного отношения в эритроцитах. Это указывает на то, что после 0,5-ти, и 6-ти часового иммобилизационного стресса наблюдается выраженное напряжение в системе глутатиона, которая, по-видимому, не обеспечивает клетку его достаточным количеством.

Роль супероксид-анионов в регуляции тонуса сосудов сердца и сократительной функции миокарда крыс, перенесших стресс различной продолжительности, после предварительного введения N-ацетил-L-цистеина. Предварительное введение предшественника синтеза глутатиона N-ацетил-L-цистеина, не оказывало влияния на сократительную функцию миокарда, но полностью предупреждало характерное для 0,5-ти часового иммобилизационного стресса снижение максимального гиперемического коронарного потока.

В сердцах крыс, перенесших 6-ти часовую иммобилизацию на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина ОСКП достоверно не изменилась, а индекс ауторегуляции, коронарный расширительный резерв снизились в меньшей степени, чем у животных, перенесших стресс без введения препарата. Введение N-ацетил-L-цистеина предупреждало характерные для 6-ти часового иммобилизационного стресса падение развиваемого внутрижелудочкового давления. Предварительное внутрибрюшинное введение N-ацетил-L-цистеина не оказывало влияния на относительную массу надпочечников и селезенки, но предупреждало характерное увеличение относительной массы надпочечников при длительном стрессе и не влияло на постстрессорные изменения относительной массы селезенки как при 0,5-ти, так и после 6-ти часовой иммобилизации. Таким образом, предварительное введение N-ацетил-L-цистеина ограничивало нарушение тонуса коронарных сосудов и сократительной активности миокарда и оказывало выраженный периферический эффект, предупреждая снижение максимального гиперемического коронарного потока при 0,5-ти часовом иммобилизационном стрессе и существенно ограничивало неблагоприятные эффекты 6-ти часовой иммобилизации, выражающиеся в появлении коронарной гипотонии, снижении сократительной функции миокарда и развитии явления гиперперфузии сердца.

Связывание супероксид-анионов тироном в сердцах крыс, перенесших 0,5-ти часовую иммобилизацию после предварительного вве-

дения N-ацетил-L-цистеина, как и в контроле, сопровождалось увеличением ОСКП, что может свидетельствовать о восстановлении подавленной при кратковременной иммобилизации регуляторной роли супероксид-анионов в отношении тонуса коронарных сосудов.

Добавление тирона в раствор, которым перфузировали сердца крыс, перенесших 6-ти часовую иммобилизацию после предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, сопровождалось более выраженным по сравнению с животными, подвергнутыми стрессу без предварительного введения препарата, приростом ОСКП. Это позволяет заключить, что N-ацетил-L-цистеин существенно ограничивает постстрессорные изменения супероксид-анион – зависимого механизма регуляции тонуса сосудов сердца.

Введение тирона вместе с L-NAME в изолированное сердце крыс, перенесших 0,5-ти, 6-ти часовую иммобилизацию на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, не сопровождалось увеличением ОСКП, снижением индекса ауторегуляции, максимального гиперемического коронарного потока и коронарного расширительного резерва по сравнению с данными, полученными при перфузии сердца раствором, содержащим только L-NAME. Развиваемое внутрижелудочковое давление в сердцах крыс перенесших стресс на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, снижалось в меньшей степени, чем у крыс, перенесших стресс без введения препарата.

Следовательно, во-первых, регуляторная роль супероксид-анионов при кратковременном стрессе, вызванном на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, как и в контрольных сердцах, была хорошо выражена и полностью зависела от высвобождения монооксида азота и его биодоступности, во-вторых; предварительное введение N-ацетил-L-цистеина уменьшало роль супероксид-анионов в регуляции сократительной активности сердца.

Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина полностью предупреждало вызванное иммобилизацией снижение содержания восстановленного глутатиона (0,5-ти, 6-ти часовой стресс) и белковых сульфгидрильных групп в миокарде крыс, перенесших 6-ти часовой стресс, а также ограничивало активацию процессов свободнорадикального окисления липидов и протеинов. Более того, после предварительного введения N-ацетил-L-цистеина не наблюдалось характерного для стресса увеличения активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в ткани миокарда, что свидетельствовало об отсутствии напряжения в системе глутатиона.

Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина сопровождалось повышением содержания нитратов/нитритов в плазме крови на 113%

и существенным ограничением характерного для стрессорного воздействия их прироста. Это, вероятно, указывает на то, что увеличение биодоступности монооксида азота является одним из возможных механизмов защитного действия N-ацетил-L-цистеина.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, договор Б03-240.

Литература

1. Солодков А.П., Дорошенко А.С., Шебеко В.И., Щербинин И.Ю. Эндотелий, ауторегуляция коронарных сосудов и стресс // Вестник Фонда фундаментальных исследований. – Минск, 2005. -№1. – С.84-99.
2. Шебеко В.И., Редокс-регуляция динамического характера фенотипа эндотелиоцитов кровеносных сосудов // Дисфункция эндотелия: экпер. и клин. исследования. Труды республик. научно-практ. конф., Витебск, 16-17 ноября 2000 г. / МЗРБ. Витебский гос. мед. университет. Белорус. обществ.
3. Girouard H, Chulak C, Wu L, Lejossec M, de Champlain J. N-acetylcysteine improves nitric oxide and alpha-adrenergic pathways in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. // Am J Hypertens.-2003.-Jul, Vol. 16, №7.-P.577-84.
4. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular function // Cell Signall.-1999.-Vol.11, №1.-P.1-14.
5. Price D.T., Vita J.A., Keane J.F.Jr. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability // Antioxid. Redox Signal.-2000.-Vol.2, №4.-P.919-935.

ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПОРТАЛЬНОЙ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Дремза И.К.

Институт биохимии НАН Беларуси

При стрессовых ситуациях повышается тонус спланхических сосудов и снижается портальный кровоток [3]. Очевидно, что изменения портального кровотока будут оказывать влияние на кислород-транспортную функцию крови и напряжение кислорода в крови и тканях. В связи с этим представляет интерес исследование особенностей кислородзависимых окислительных процессов в портальной крови при стрессе.

Материал и методы исследования

Эксперименты выполнены на неинбредных белых крысах-самцах массой 150-200 г. Стресс вызывали комплексом раздражителей (света, звука и электрического тока). Действие раздражителей